动 物 学 研 究 2012，Apr. 33(2): 211−217　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.02211

IFN-γ、IL-1α、NGF-β 和 TNF-α 在皖西白鹅小脑皮质发育中的表达

宋海燕，刘再群*，郑　磊

（安徽师范大学 生命科学学院，安徽省重要生物资源保护与利用重点实验室，芜湖　241000）

摘要：用免疫组织化学 strept actividin-biotin complex(SABC)法，以干扰素-γ(IFN-γ)、白介素-1α(IL-1α)、神经生长因子-β(NGF-β)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)对胚龄 13 d、19 d、24 d、28 d(E13、E19、E24、E28)和日龄 7 d、15 d(P7、15)的皖西白鹅(Western Anhui white goose)小脑皮质中的阳性细胞进行定位和半定量检测，探讨 IFN-γ、IL-1α、NGF-β 和 TNF-α 在小脑皮质发育中的作用。研究表明，外颗粒层细胞在 E13、E19、E24、E28、P7 有 IFN-γ 和 TNF-α 阳性表达；在 E13、E19、E24、E28 有 IL-1α 阳性表达；在 E13、E19、E24 有 NGF-β 阳性表达；且在所检测的 6 个时期中，4 种细胞因子均在 E19 表达最强。Purkinje 细胞层在 E13、E19、E24、E28、P7、P15 均有 IFN-γ、IL-1α、TNF-α 阳性表达；在 E13、E19、E24、E28、P7 有 NGF-β 阳性表达；内颗粒层细胞在 E13、E19、E24、E28、P7、P15 有 IFN-γ 阳性表达；在 E13、E19、E24、E28、P7 有 IL-1α、TNF-α 阳性表达；在 E13、E19、E24、E28 有 NGF-β 阳性表达。结果表明，E19 可能为小脑皮质发育的“关键期”；IFN-γ、IL-1α 和 TNF-α 可能由小脑皮质自身合成；NGF-β 可能由投射到 Purkinje 细胞的区域转运而来，且可能在 Purkinje 细胞生长发育过程中起营养作用；IFN-γ 可能在颗粒细胞迁移过程中起干扰作用。

关键词：皖西白鹅；小脑皮质；发育；细胞因子；免疫组织化学
中图分类号：Q426; Q593+.2; Q915.865　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0254-5853-(2012)02-0211-07

Expression of IFN-γ, IL-1α, NGF-β and TNF-α during the development of cerebellar cortex of Western Anhui white goose

SONG Hai-Yan, LIU Zai-Qun*, ZHENG Lei

(*Provincial Key Laboratory for the Conservation and Utilization of Important Biological Resources*, *College of Life Sciences*, *Anhui Normal University*, *Wuhu*　241000, *China*)

Abstract: The strep avidin-biotin-peroxidase complex (SABC) immunohistochemical methods were applied to investigate the localization and semi-quantitative distribution of IFN-γ, IL-1α, NGF-β and TNF-α-immunoreactive cells in the cerebellar cortex of Western Anhui white goose at embryonic day 13, 19, 24, 28 (E13, E19, E24, E28) and postnatal day 7, 15 (P7, P15). The possible roles of IFN-γ、IL-1α、NGF-β and TNF-α in the development of cerebellar cortex were discussed. The results indicated that in the external granular layer, there were IFN-γ and TNF-α positive cells at E13, E19, E24, E28, P7, IL-1α positive cells at E13, E19, E24, E28 and NGF-β positive cells at E13, E19 , E24. The expression levels of these four cytokines all reached peaks at E19 of the six tested periods in this study. In the Purkinje cell layer, there were IFN-γ, IL-1α and TNF-α positive cells at E13, E19, E24, E28, P7, P15 and NGF-β positive cells at E13, E19, E24, E28, P7. In the internal granular layer, there were IFN-γ positive cells at E13, E19, E24, E28, P7, P15, IL-1α and TNF-α positive cells at E13, E19, E24, E28, P7 and NGF-β positive cells at E13, E19, E24, E28. These results showed that E19 might be the “critical stage” in the cerebellar cortex development of Western Anhui white goose. IFN-γ, IL-1α and TNF-α might be synthesized by cerebellar cortex itself, and NGF-β could be transported from regions which project to Purkinje cells. IFN-γ may interfer the transfer of granular cells, and NGF-β may have neurotrophic functions that are beneficial to the growth and development of Purkinje cells.

收稿日期：2011-12-01；接受日期：2012-01-09
基金项目：安徽师范大学博士科研启动基金(160-750932),生科院联合开放课题经费；“安徽重要生物资源保护与利用研究”安徽省重点实验室科研基金
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: liuzaiqun@126.com
第一作者简介：宋海燕(1986−)，男，安徽肥东人，硕士研究生，研究方向：神经生物学, E-mail: songhaiyan009@126.com

Key words: Western Anhui white goose; Cerebellar cortex; Development; Cytokines; Immunohistochemistry

干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)、白介素-1α (interleukin-1α, IL-1α)、神经生长因子-β (nerve growth factor-β, NGF-β)和肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)是细胞因子中的四个成员。它们分布在多种组织中,可作为介质对神经系统起重要的调节作用。研究报道,干扰素在大鼠中枢神经系统损伤、生长发育和生理功能中起重要作用(Popko et al, 1997); 白介素-1 可促进星形胶质细胞的增殖与分化,在大鼠胚胎发育中对中枢神经系统起重要的调节作用,并通过作用于白介素-1 受体(Interleukin1 receptor, IL-1R),促进神经元合成和释放化学递质(Eriksson et al, 2000; Gustafson-Vickers et al, 2008); 神经生长因子在来亨鸡脊髓胚胎发育中对其生长发育起促进作用(Dai & Xiyang, 2009),并与大鼠小脑皮质 Purkinje 细胞的生理功能(Ba et al, 2006)和诱导猕猴神经样细胞的生成(Pei & Ji, 2003)等有关; 肿瘤坏死因子可促进大鼠星形胶质细胞分泌 NGF(Cheng & Guo, 1999),与大鼠的神经元的分化和神经退行性疾病(Oldreive & Doherty, 2010)等都有重要的关系。

皖西白鹅(Western Anhui white goose)是我国优良的中型鹅品种之一,属于鸟纲雁形目鸭科动物,是国家二级禽类保护动物,并被确定为"国家级畜禽品种资源保护"品种。研究表明,成年皖西白鹅大脑和小脑表达促生长激素释放肽(ghrelin),该物质可能以自分泌/旁分泌的形式调节中枢神经系统(Fang et al, 2008); 间脑、中脑和脑桥表达血管活性肠肽(vasoactise intestinal peptide, VIP),可能与调节视觉、听觉和肌紧张的功能有关(Jiang et al, 2004, 2005)。而上述 4 种细胞因子在皖西白鹅中枢神经系统发育中的相关研究未见报道。鉴于此,本实验通过免疫组织化学方法,研究 IFN-γ、IL-1α、NGF-β 和 TNF-α 在皖西白鹅小脑皮质发育过程中的表达规律,为进一步研究细胞因子在家禽中枢神经系统发育中的作用机制提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 材料及组织准备

由安徽省六安市裕安区国家级皖西白鹅种鹅场提供 E13、E19、E24、E28 皖西白鹅胚各 3 枚, P7、P15 雏鹅各 3 只。胚蛋先剥开蛋壳,取出新鲜鹅胚,入 37 ℃生理盐水,剥除胎膜,以后试验步骤鹅胚和雏鹅相同。打开胸腔,暴露心脏,经主动脉依次灌注 37 ℃生理盐水 20～25 mL, 4 ℃的 4%多聚甲醛 40～50 mL; 打开颅腔,迅速取出小脑(E13 取整体脑); Bouin's 液固定 48 h 后,梯度酒精脱水、透明和石蜡包埋; 连续切片,厚度 7 μm,隔 5 张取 5 张,形成 5 套切片(50 片/套); 裱片于辛基酚聚氧乙烯醚硫酸盐(APES)处理的载玻片上,置于 37 ℃温箱烘干,分别用于 IFN-γ、IL-1α、NGF-β、TNF-α 免疫组化染色和阴性对照。

1.2 免疫组织化学染色

各发育时期的第 1-4 套切片采用免疫组化 SABC 法染色。一抗及 SABC 试剂盒(编号为 SA1022)等均购自武汉博士德公司,步骤如下: ①切片常规脱蜡至水; ②30%$H_2O_2$1 份+蒸馏水 10 份混合,室温 5～10 min 以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗 3 次; ③热修复抗原,冷却后 PBS(pH7.2～7.6)洗涤 1～2 次; ④滴加 5%BSA 封闭液(来自 SABC 试剂盒),室温 20 min,甩去多余液体,不洗; ⑤滴加适当稀释的一抗(IFN-γ、IL-1α、NGF-β 和 TNF-α,一抗均为即用型兔血清多克隆抗体,浓度为 5～10 μg/mL,编号依次为 BA0952、BA1643、BA0611 和 BA0131), 4 ℃过夜, PBS 洗 2 min×3 次; ⑥滴加生物素化二抗(即用型山羊抗兔 IgG,浓度为 5～10 μg/mL,编号为 BA1003), 20～37 ℃ 20 min; PBS 洗 2 min×3 次; ⑦滴加试剂 SABC, 20～37 ℃ 20 min, PBS 洗 5 min×4 次;⑧DAB 显色剂(为×20 倍浓缩型显色试剂,编号为 AR1022,蒸馏水 17 份+试剂 A、B、C 各 1 份混匀)显色,镜下控制时间,一般为 5～30 min; ⑨苏木素轻度复染,常规脱水,透明,中性树胶封片。第 5 套切片做阴性对照实验,以 PBS 代替一抗孵育切片,其它步骤同 SABC 法。

1.3 数据处理

分别从各发育时期的 IFN-γ、IL-1α、NGF-β 和 TNF-α 免疫组化染色的切片中随机取 10 张。在 Olympus BX-61 型显微镜下观察,并用 Image-Pro Express 6.0 图像分析软件进行图像采集和光密度(optical density, OD)值分析,并用 mean±*SD* 表示,光

密度值与免疫阳性程度呈正比，即光密度值越大，阳性程度越强。采用 SPSS17.0 数据统计分析软件中的 one way ANOVA 进行显著性检验，$P<0.05$ 时为显著性差异，$P>0.05$ 为无显著性差异。

2　结　果

皖西白鹅小脑皮质是由位于菱形窝(rhomboid fossa)头端两侧的板状突起，即小脑板(cerebellar plate)发生形成的。小脑皮质在 E13 由外向内形成外颗粒层(external granular layer, EGL)、Purkinje 细胞层(Purkinje cell layer, PCL)和内颗粒层(internal granular layer, IGL)；在 E19、E24、E28、P7 和 P15 由外向内形成外颗粒层、分子层(molecular layer, ML)、Purkinje 细胞层和内颗粒层四层。以下为四种细胞因子分别在皖西白鹅不同发育阶段小脑皮质中的免疫组织化学检测结果。

2.1　IFN-γ

EGL：E13、E19、E24、E28 和 P7 有阳性细胞表达(图 1a−e); P15 细胞表达呈阴性。

ML：E24、E28、P7 和 P15 有阳性细胞表达(图 1c−f)。

PCL：Purkinje 细胞为 IFN-γ 阳性细胞。E13 和 E19 胞质呈阳性表达(图 1a,b); E24 表达位于胞质和树突基部(图 1c); E28 表达位于胞体和主树突(图 1d); P7 表达主要位于胞质、主树突及其部分分支(图 1e); P15 表达主要位于胞质(图 1f)。

IGL：E13、E19、E24、E28、P7 和 P15 均有阳性细胞表达(图 1a-f)。

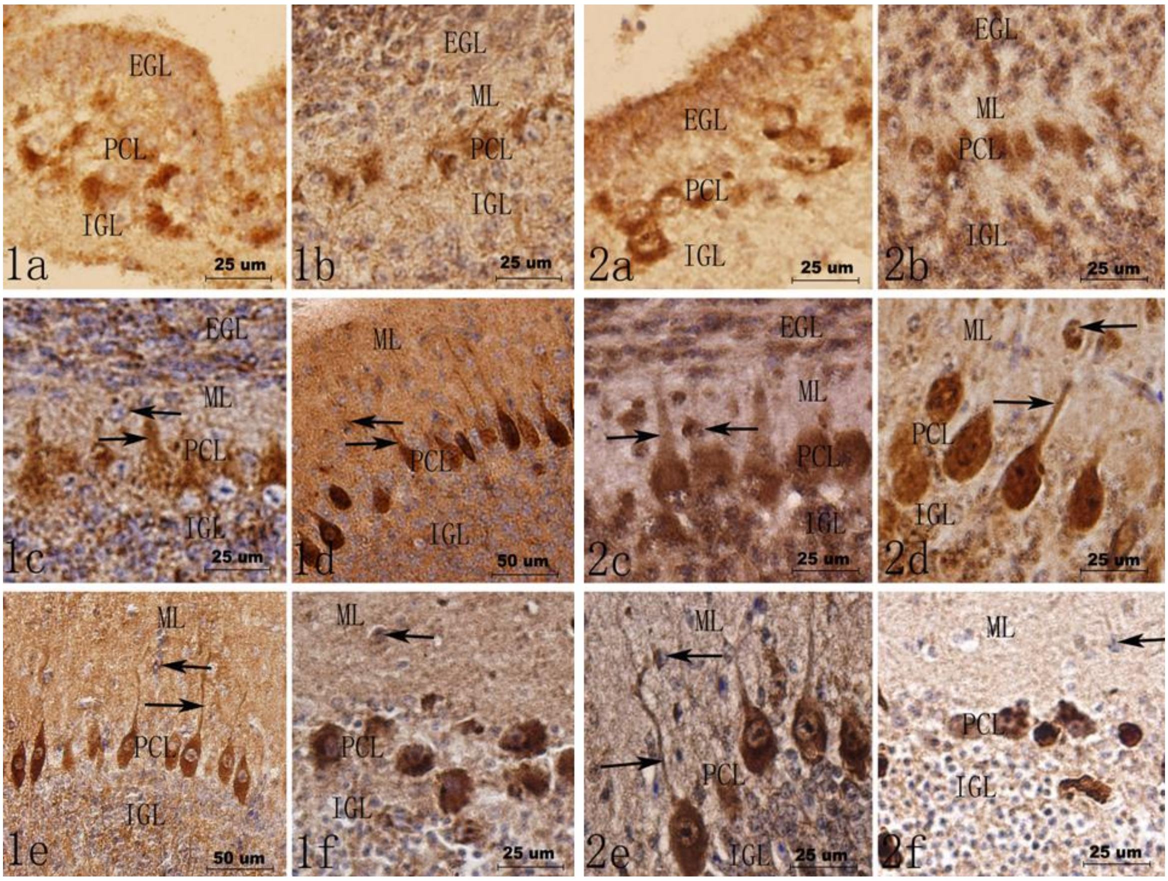
2.2　IL-1α

EGL：E13、E19、E24 和 E28 有阳性细胞表达(图 2a−c); P7 和 P15 细胞表达呈阴性。

ML：E24、E28、P7 和 P15 有阳性细胞表达(图 2c-f)。

PCL：Purkinje 细胞为 IL-1α 阳性细胞。E13 阳性表达位于胞质和胞核(图 2a)；E19 表达位于胞质(图 2b); E24 和 E28 表达位于胞体及主树突(图 2c, d); P7 表达位于胞质和主树突(图 2e)；P15 表达主要位于在胞质(图 2f)。

IGL：E13、E19、E24、E28 和 P7 有阳性细胞表达(图 2a−e); P15 细胞表达呈阴性(图 2f)。



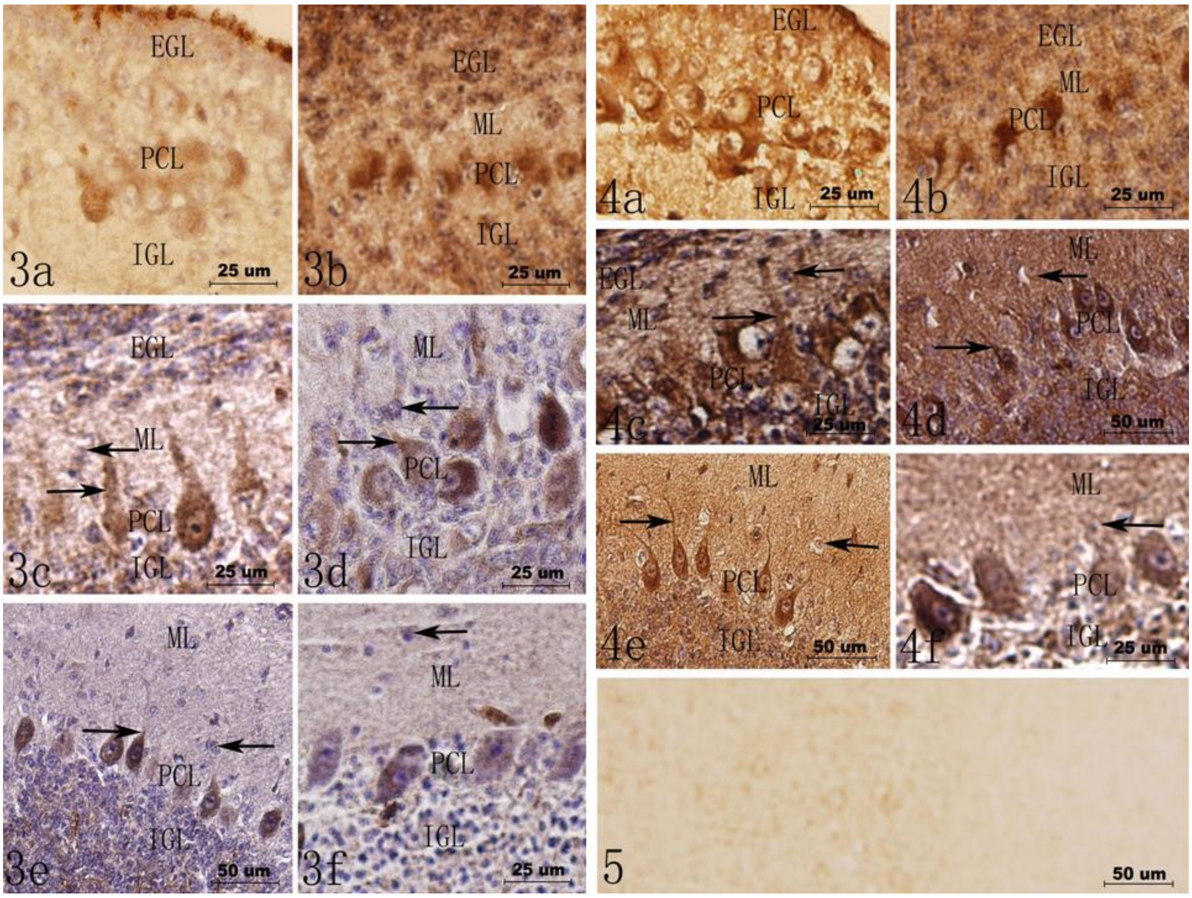


图 1 小脑皮质发育中 IFN-γ、IL-1α、NGF-β 和 TNF-α 的表达

Fig. 1 The expression of IFN-γ, IL-1α, NGF-β and TNF-α in the cerebellar cortex during development

图 1a−1f) IFN-γ 的表达; 图 2a−2f) IL-1α 的表达; 图 3a−3f) NGF-β 的表达; 图 4a−4f) TNF-α 的表达; 图 5) 阴性对照组。(a: E13; b: E19; c: E24; d: E28; e: P7; f: P15; EGL：外颗粒层, ML：分子层, PCL：Purkinje 细胞层, IGL：内颗粒层; →: 示 Purkinje 细胞树突, ←: 示分子层中的细胞) 。

Fig. 1a−1f) the expression of IFN-γ; Fig.2a−2f) the expression of IL-1α; Fig.3a−3f) the expression of NGF-β; Fig.4a−4f) the expression of TNF-α; Fig.5) immuno-negative control group. (a: E13; b: E19; c: E24; d: E28; e: P7; f: P15; EGL: external granular layer; ML: molecular layer; PCL: Purkinje cell layer; IGL: internal granular layer; →: showing the dendrite of Purkinje cell; ←: showing the cells of molecular layer).

2.3 NGF-β

EGL：E13、E19 和 E24 有阳性细胞表达(图 3a−c); E28、P7 和 P15 细胞表达呈阴性。

ML：E24 和 E28 有阳性细胞表达(图 3c, d); P7 和 P15 细胞表达呈阴性(图 3e,f)。

PCL：Purkinje 细胞为 NGF-β 阳性细胞。E13 和 E19 阳性表达位于胞质(图 3a, b); E24、E28 和 P7 表达主要位于胞质和树突基部(图 3c−e); P15 表达呈阴性(图 3f)。

IGL：E13、E19、E24 和 E28 有阳性细胞表达(图 3a−d); P7 和 P15 细胞表达呈阴性(图 3e, f)。

2.4 TNF-α

EGL：E13、E19、E24、E28 和 P7 有阳性细胞表达(图 4a−e); P15 时细胞表达呈阴性。

ML：E24、E28、P7 和 P15 均有阳性细胞表达(图 4c−f)。

PCL：Purkinje 细胞为 TNF-α 阳性主要反应细胞。E13 和 E19 表达主要位于胞质(图 4a, b); E24 和 E28 阳性表达主要位于胞质和树突基部(图 4c, d); P7 阳性表达主要位于胞质和主树突(图 4e); P15 阳性表达位于胞质(图 4f)。

IGL：E13、E19、E24、E28 和 P7 有阳性细胞表达(图 4a−e); P15 细胞表达呈阴性(图 4f)。

对照组切片为阴性(图 5)。

2.5 IFN-γ、IL-1α、NGF-β 和 TNF-α 的半定量检测

不同胚龄/日龄皖西白鹅小脑皮质 EGL、PCL、IGL 细胞中 IFN-γ、IL-1α、NGF-β 和 TNF-α 表达阳性反应产物的光密度值见表 1。

由表 1 可见，在皖西白鹅小脑皮质发育中，IFN-γ、IL-1α、NGF-β 和 TNF-α 分别在外颗粒层、Purkinje 细胞层和内颗粒层细胞中表达量不同。从同种细胞因子分析, IFN-γ 的免疫反应强度，在外颗

表 1　IFN-γ、IL-1α、NGF-β 和 TNF-α 免疫反应产物的光密度(mean±*SD*, *n*=10)

Tab. 1　Optical densities of IFN-γ, IL-1α, NGF-β and TNF-α-immunoreactive cells in developmental cerebellar cortex (mean±*SD*, *n*=10)

细胞因子 Cytokines	皮质分层 Cortex hierarchy	发育天数 Development days					
		E13	E19	E24	E28	P7	P15
IFN-γ	EGL	0.24±0.03[a]	0.32±0.05[b]	0.29±0.05[bc]	0.26±0.03[ac]	0.15±0.05[d]	—
	PCL	0.39±0.08[a]	0.36±0.05[a]	0.33±0.05[a]	0.76±0.09[b]	0.51±0.07[c]	0.53±0.06[c]
	IGL	0.19±0.03[a]	0.24±0.04[b]	0.22±0.05[ab]	0.32±0.06[c]	0.21±0.04[ab]	0.22±0.06[ab]
IL-1α	EGL	0.27±0.03[a]	0.32±0.04[b]	0.27±0.04[a]	0.31±0.07[a]	—	—
	PCL	0.42±0.08[a]	0.37±0.04[a]	0.42±0.03[a]	0.63±0.05[b]	0.54±0.08[c]	0.33±0.04[d]
	IGL	0.15±0.04[a]	0.28±0.05[b]	0.29±0.04[bd]	0.34±0.06[bd]	0.35±0.08[cd]	—
NGF-β	EGL	0.14±0.02[a]	0.34±0.05[b]	0.16±0.06[a]	—	—	—
	PCL	0.21±0.04[a]	0.42±0.03[b]	0.31±0.06[c]	0.19±0.06[ad]	0.15±0.04[d]	—
	IGL	0.16±0.04[a]	0.31±0.04[b]	0.21±0.05[c]	0.05±0.01[d]	—	—
TNF-α	EGL	0.32±0.04[a]	0.37±0.05[ab]	0.31±0.08[ac]	0.14±0.04[d]	0.23±0.03[e]	—
	PCL	0.38±0.04[a]	0.43±0.05[bc]	0.47±0.06[b]	0.44±0.07[bd]	0.48±0.04[b]	0.41±0.07[acd]
	IGL	0.18±0.02[a]	0.33±0.03[b]	0.30±0.07[bc]	0.27±0.06[c]	0.34±0.05[b]	—

同行数据右上角字母不同表示有显著性差异(P<0.05)，相同字母表示无显著差异性(P>0.05); —：无阳性细胞。

In the same line, the superscripts with different letters mean significant difference (P<0.05), whereas, with same letters mean insignificant difference (P>0.05); —：No positive cells.

粒层中，E13-E19 表达上升，并在 E19 表达最强，E19-P7 表达呈下降趋势；在 Purkinje 细胞层中，E13-E24 表达趋于稳定(P>0.05), E24-E28 表达上升，并在 E28 表达最强，出壳后表达下降但趋于稳定(P7 和 P15, P>0.05)；在内颗粒层中, E13-E28 表达呈上升趋势，出壳后表达下降但趋于稳定(P7 和 P15, P>0.05)。IL-1α 的免疫反应强度，在外颗粒层中，E13-E19 表达上升，E19 表达最强，E19-E24 表达下降，E24-E28 表达趋于稳定(P>0.05)；在 Purkinje 细胞层中，E13-E24 表达趋于稳定(P>0.05)，E24-E28 表达上升，E28-P15 呈下降趋势；在内颗粒层中，E13-P7 表达呈上升趋势。NGF-β 的免疫反应强度，在外颗粒层中，E13-E19 表达上升，E19 表达最强，E19-E24 表达下降；在 Purkinje 细胞层中，E13-E19 表达上升, E19 表达最强, E19-P7 的表达呈下降趋势; 在内颗粒层中，E13-E19 表达上升，E19-E28 表达呈下降趋势。TNF-α 的免疫反应强度，在外颗粒层中，E13-E24 表达量趋于稳定(P>0.05)，E24-E28 表达下降， E28-P7 表达上升；在 Purkinje 细胞层中，E13-E19 表达上升，E19-P7 表达趋于稳定(P>0.05)，P7-P15 表达下降；在内颗粒层中，E13-E19 表达上升, E19-E28 表达呈下降趋势， E28-P7 表达上升。说明在皖西白鹅小脑皮质发育的不同时期 IFN-γ、IL-1α、NGF-β 和 TNF-α 的分泌量有所差异。

3　讨　论

在小脑皮质的组织发生中，神经上皮的迁移有其独特之处。小脑板上具有增殖能力的神经上皮细胞通过套层外迁到边缘层表面首先形成次生的外颗粒层，外颗粒层细胞通过一段时间的有丝分裂后又进行内迁，外颗粒层细胞内迁并最终定居于内颗粒层，保留下来的部分细胞分化为篮细胞和星形细胞参与形成分子层。Purkinje 细胞层是从室管膜层迁移的神经上皮细胞到外颗粒层下方形成的较大细胞带。研究表明，从鸡小脑皮质发育早期(E3-E8)的 E5 开始，Purkinje 细胞逐渐向外迁移到套层，到 E8 时，Purkinje 细胞成簇排列成一条带。在发育中期(E9-E15)，外颗粒层细胞开始向内迁移形成内颗粒层，至发育后期的 E16，外颗粒层细胞大量内迁(Karam et al, 2000)。本实验结果显示, E13-E19 外颗粒层细胞开始内迁并形成内颗粒层，在 E19 期外颗粒层细胞开始大量内迁，到 P15 趋于消失。这表明皖西白鹅和鸡小脑皮质发育的基本过程相似。在本实验所检测的六个时期中，四种细胞因子在 E19 期的外颗粒层细胞表达程度均最强，结合本实验组已发表的数据(Song et al, 已录用待发表资料)，推测 E19 期可能是皖西白鹅小脑皮质发育的“关键期”，是外颗粒层细胞开始大量内迁的标志，有待于通过分子生物学技术进一步验证。

IFN-γ 在促进大鼠神经元的发生和神经系统修复方面起重要作用(Kim et al, 2007)，并通过 Janus 激酶/信号转导和转录激活因子 [(Janus tyrosine kinase, Jak)/(signal transducers and activators of transcription, STAT), Jak-STAT]信号通路调节神经

细胞的增殖与分化(Monroe et al, 2006)。提高 IFN-γ 在大鼠中枢神经系统表达可以诱导 T 细胞的浸润、激活巨噬细胞和上调诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的活性，参与中枢神经系统的免疫调节(Lin et al, 2008)。成年 SD 大鼠的小脑皮质中存在 IFN-γ 阳性细胞和纤维(Sun et al, 2002)，本实验未观察到 IFN-γ 阳性神经纤维，可能与小脑皮质处于发育期有关。在大鼠小脑皮质发育中，IFN-γ 对外颗粒层细胞的迁移起干扰作用(Lin et al, 2004)，本实验表明, IFN-γ 在 E13-E19 在外颗粒层细胞中表达上升, E19 表达最强, E19 后表达逐渐减弱, P15 表达呈阴性。推测外颗粒层细胞在 E13-E19 内迁逐渐加强, IFN-γ 的干扰作用上升; E19 外颗粒层细胞内迁到达最大，IFN-γ 的干扰作用也达到最强；E19 后随小脑皮质逐渐发育，外颗粒层细胞内迁逐渐减弱，IFN-γ 的干扰作用也随之逐渐减弱；P15 小脑皮质发育接近成熟，内迁已完成，IFN-γ 的干扰作用也随之消失。

IL-1 在胚胎发育过程中对中枢神经系统起重要的调节作用，可促进星形胶质细胞增殖与分化及神经递质的合成和释放 (Gustafson-Vickers et al, 2008)；IL-1α 在大鼠中脑能诱导神经干细胞分化为为神经元和神经胶质细胞(Liu et al, 2005)；胚胎期大鼠小脑胶质细胞中的 IL-1α 可产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)，在炎症反应中起重要作用(Hong et al, 2006)。在大鼠小脑、大脑皮质和脑干等部位存在 IL-1α mRNA 的表达(Hong et al, 2006; Ohmi et al, 2009)。本实验结果显示，在皖西白鹅小脑皮质发育中存在 IL-1α，其中 Purkinje 细胞为 IL-1α 的主要阳性反应细胞，在 E13、E19 和 E24 的 Purkinje 细胞中表达趋于稳定, E24-E28 时表达上升, 出壳前后(E28 和 P7)表达强度均强于其他时期, P7-P15 表达下降。推测 IL-1α 可促进 Purkinje 细胞合成和释放化学递质, E13、E19 和 E24 小脑皮质处于生长发育的初期，Purkinje 细胞合成和释放递质较为恒定；E24-E28 小脑皮质开始进入快速发育成熟阶段, Purkinje 细胞合成和释放递质随之增加；在出壳前后(E28 和 P7)可能为小脑皮质发育成熟的快速阶段，Purkinje 细胞加速合成和释放递质；P7-P15 小脑皮质接近发育成熟，Purkinje 细胞合成和释放递质随之减弱。

中枢神经系统内小胶质细胞可产生 NGF-β，具有重要的神经保护作用(Sawada et al, 2007)，在大鼠神经系统中 NGF 通过 TrkA(tyrosine kinase-receptor) 和 NTR(p75 neurotrophin receptor)两种受体调节神经细胞的生存和凋亡(Yoon et al, 1998)。另有研究表明，胚胎期食蟹猴小脑内的 NGF 表达水平较高, P60 时则降到原水平的 1/3(Hayashi et al, 1990)。在胚胎期 14 到 21 周山羊小脑皮质发育过程中, NGF-β 在 Purkinje 细胞的表达随胚龄增加逐渐增强，并对 Purkinje 细胞的生长发育起重要的营养作用(Qing et al, 2004)。本实验表明, NGF-β 在 E13-E19 在 Purkinje 细胞层中表达上升，E19 后表达程度随发育天数的增加而减弱，P15 表达呈阴性。推测 E13-E19 的 Purkinje 细胞处于生长发育阶段，NGF-β 的营养作用加强；E19 后随着 Purkinje 细胞逐渐发育成熟, NGF-β 的营养作用也逐渐减弱; P15 时 Purkinje 细胞已经发育成熟, NGF-β 的营养作用也随之消失。

中枢神经系统内神经细胞和小胶质细胞产生的 TNF-α 可促进 T 细胞的产生，参与神经免疫调控(Virna et al, 2006)，并可作为一种神经调质或共存递质来调节中枢神经系统的功能(Breder et al, 1993), 在促进星形胶质细胞分泌神经生长因子(Cheng & Guo, 1999)和神经元分化(Oldreive & Doherty, 2010)等方面也起重要作用。本实验结果显示, Purkinje 细胞为 TNF-α 的主要阳性反应细胞, TNF-α 在 E13-E19 在 Purkinje 细胞中表达上升，在 E19、E24、E28 和 P7 表达趋于稳定，P7-P15 表达下降。推测 TNF-α 可作为一种神经调质或共存递质参与调节小脑皮质的生长发育，E13-E19 小脑皮质处于生长发育阶段，调节作用上升；E19、E24、E28 和 P7 小脑皮质处于发育成熟阶段，调节作用稳定；P7-15 小脑皮质接近发育成熟，调节作用也随之减弱。

在皖西白鹅小脑皮质发育中，IFN-γ、IL-1α、NGF-β 和 TNF-α 在外颗粒层、Purkinje 细胞层和内颗粒层表达规律不同，可能与它们在小脑皮质发育期间通过不同的作用机制参与发育和免疫调控有关。推测 IFN-γ、IL-1α 和 TNF-α 可能由小脑皮质自身合成，NGF-β 可能由投射到 Purkinje 细胞的区域转运而来或自分泌产生，它们作为神经递质或调质参与小脑皮质的发育和免疫调控。

参考文献：

Ba YC, Wang TH, Pan XH. 2006. Immunohistochemical study on the expression of NGF, BDNF and NT-3 in primary regions of brain of normal adult rats[J]. *Anat Res*, **28**(3): 165-168. [巴迎春, 王廷华, 潘兴华. 2006. NGF、BDNF 和 NT-3 在正常成年大鼠主要脑区表达的免疫组织化学研究[J]. 解剖学研究, **28**(3): 165-168.]

Breder CD, Tsujimoto M, Terano Y, Scott DW, Saper CB. 1993. Distribution and characterization of tumor necrosis factor-α-like immunoreactivity in the murine central nervous system[J]. *J Comp Neurol*, **337**(4): 543-567.

Cheng XX, Guo J. 1999. Influence of tumor necrosis factor-α (TNF-α) on NGF secretion in newborn rat astrocytes *in vitro*-an experimental study[J]. *Chin J Neur*, **5**(3): 290-292. [程欣欣, 郭静. 1999. 肿瘤坏死因子影响星形胶质细胞分泌神经生长因子的实验研究[J]. 神经解剖学杂志, **5**(3): 290-292.]

Dai P, Xiyang YB. 2009. The expression level of NGF, BDNF and NT-3 in spinal cord of growthing embryonic chicken[J]. *J Sichuan Univ (Med Sci Ed)*, **40**(4): 676-678. [戴萍, 习杨彦彬. 2009. NGF、BDNF 和 NT-3 在鸡胚脊髓发育中的表达变化[J]. 四川大学学报(医学版), **40**(4): 676-678.]

Eriksson C, Nobel S, Winblad B, Schultzberg M. 2000. Expression of interleukin-1α and β, and interleukin1 receptor antagonist mRNA in the rat central nervous system after peripheral administration of lipopolysaccharides[J]. *Cytokine*, **12**(5): 423-431.

Fang FG, Jiang SD, Li MQ, Zhang LX, Li FB, Ding SQ. 2008. Immunohistochemical localization of ghrelin in the cerebrum and cerebellum of adult Wanxi white goose[J]. *Chin J Vet Sci*, **28**(7): 809-811. [方富贵, 蒋书东, 李梅清, 张丽霞, 李福宝, 丁淑荃. 2008. Ghrelin 在成年皖西白鹅大、小脑内的免疫组化定位[J]. 中国兽医学报, **28**(7): 809-811.]

Gustafson-Vickers SL, Lu VB, Lai AY, Todd KG, Ballanyi K, Smith PA. 2008. Long-term actions of interleukin-1β on delay and tonic firing neurons in rat superficial dorsal horn and their relevance to central sensitization[J]. *Mol Pain*, **4**(1): 63-73.

Hayashi M, Yamashita A, Shimizu K. 1990. Nerve growth factor in the primate central nervous system: regional distribution and ontogeny[J]. *Neuroscience*, **36**(3): 683-689.

Hong YB, Kim EY, Jung SC. 2006. Upregulation of proinflammatory cytokines in the fetal brain of the gaucher mouse[J]. *J Korean Med Sci*, **21**(4): 733-738.

Jiang SD, Zhang XR, Li FB, Zhang LX, Fang FG. 2005. Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) in diencephalons of Wanxi goose[J]. *Chin J Vet Sci*, **25**(5): 502-504. [蒋书东, 章孝荣, 李福宝, 张丽霞, 方富贵. 2005. 血管活性肠肽在皖西白鹅间脑内的定位分布[J]. 中国兽医学报，**25**(5): 502-504.]

Jiang SD, Zhou TH, Zhang LX, Zhang XR, Li FB. 2004. Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal peptide in midbrain and pons of Wanxi white goose[J]. *Chin J Vet Sci Technol*, **34**(11): 59-62. [蒋书东, 周天红, 张丽霞, 章孝荣, 李福宝. 2004. 血管活性肠肽在皖西白鹅中脑和脑桥内的分布[J]. 中国兽医科技, **34**(11): 59-62.]

Karam SD, Burrows RC, Logan C, Koblar S, Pasquale EB, Bothwell M. 2000. Eph receptors and ephrins in the developing chick cerebellum: relationship to sagittal patterning and granule cell migration[J]. *J Neurosci*, **20**(17): 6488-6500.

Kim SJ, Son TG, Kim K, Park HR, Mattson MP, Lee J. 2007. Interferon-γ promotes differentiation of neural progenitor cells via the JNK pathway[J]. *Neurochem Res*, **32**(8): 1399-1406.

Lin WS, Kemper A, Mccarthy KD, Pytel P, Wang JP, Campbell IL, Utset MF, Popko B. 2004. Interferon-γ induced medulloblastoma in the developing cerebellum[J]. *J Neurosci Res*, **24**(45): 10074-10083.

Lin WS, Kunkler PE, Harding HP, Ron D, Kraig RP, Popko B. 2008. Enhanced integrated stress response promotes myelinating oligodendrocyte survival in response to interferon-γ[J]. *Am J Pathol*, **173**(5): 1508-1517.

Liu B, Liu HT, Peng CH, Tian YH. 2005. Interleukin-1α induce differentiation of mesencephalic neural stem cells of embryo mice-derived[J]. *J Yangtze Univ (Nat Sci Ed)*, **2**(12): 343-346. [刘兵, 刘洪涛, 彭超华, 田毅浩. 2005. IL-1α 诱导胚鼠中脑神经干细胞分化的实验研究[J]. 长江大学学报(自然科学版), **2**(12): 343-346.]

Monroe RK, Halvorsen SW. 2006. Mercury abolishes neurotrophic factor-stimulated Jak-STAT signaling in nerve cells by oxidative stress[J]. *Toxicol Sci*, **94**(1): 129-138.

Ohmi Y, Tajima O, Ohkawa Y, Mori A, Sugiurac Y, Furukawa K, Furukawa K. 2009. Gangliosides play pivotal roles in the regulation of complement systems and in the maintenance of integrity in nerve tissues[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**(52): 22405-22410.

Oldreive CE, Doherty GH. 2010. Effects of tumour necrosis factor-alpha on developing cerebellar granule and Purkinje neurons *in vitro*[J]. *J Mol Neurosci*, **41**(1): 44-52.

Pei YJ, Ji WZ. 2003. Induced differentiation and apoptosis of rhesus monkey embryonic stem cells[J]. *Zool Res*, **24**(3): 161-167. [裴轶劲, 季维智. 2003. 猕猴胚胎干细胞的诱导分化和凋亡[J]. 动物学研究, **24**(3): 161-167.]

Popko B, Corbin JG, Baerwald KD, Dupree J, Garcia AM. 1997. The effects of interferon-γ on the central nervous system[J]. *Mol Neurobiol*, **14**(1-2): 19-35.

Qing SZ, Xu YP, Zhao HY, Zhang Y. 2004. Expression of NGF and TrKA in developing cerebellum of goat fetus[J]. *Animal Biotechnology Bulletin*, **9**(1): 218-223. [卿素珠, 徐永平, 赵慧英, 张涌. 2004. 山羊小脑发育过程中NGF及其受体TrKA的表达[J]. 动物生物技术通讯, **9**(1): 218-223.]

Sawada H, Hishida R, Hirata Y, Ono K, Suzuki H, Muramatsu SI, Nakano I, Nagatsu T, Sawada M. 2007. Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine[J]. *J Neurosci Res*, **85**(8): 1752-1761.

Song HY, Liu ZQ, Zheng L. The expression of DRD1 in the development cerebellar cortex of wan-xi white goose[J]. *Sichuan Journal of Zoology* (accepted, in publish) [宋海燕, 刘再群, 郑磊. 多巴胺受体 1 在皖西白鹅小脑皮质发育中的表达[J]. 四川动物. (已录用, 待发表)]

Sun ZH, Zhao HY, Huge JLT, Ouyang WQ, Yang ZQ, Chen SL, Li YL. 2002. Immunohistochemical localization of IFN-γ in cerebellum of rats[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, **22**(1): 59-60. [孙志宏, 赵慧英, 胡格吉乐图, 欧阳五庆, 杨增岐, 陈树林, 李育良. 2002. IFN-γ 在大鼠小脑内定位分布的免疫组织化学研究[J]. 中国兽医学报, **22**(1): 59-60.]

Virna S, Decker M, Lütjen S, Soltek S, Foulds KE, Shen H, Körner H, Sedgwick JD, Schlüter D. 2006. TNF is important for pathogen control and limits brain damage in murine cerebral listeriosis[J]. *J Immunol*, **177**(6): 3972-3982.

Yoon SO, Casaccia-Bonnefil P, Carter B, Chao MV. 1998. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival[J]. *J Neurosci*, **18**(9): 3273-3281.